

Über die Steigerung der Schwimmleistung der Ratte durch Cytochrom C

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
ARTUR KALWA
aus Frankfurt am Main

1965

Frankfurt am Main

1964

Über die Steigerung der Schwimmleistung
der Ratte durch Cytochrom C.

Inauguraldissertation zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe Universität
zu Frankfurt am Main.

vorgelegt von
Artur Kalwa
aus Frankfurt am Main.

Frankfurt am Main 1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026



Dekan: Professor Dr. W. Rotter

Referent: Professor Dr. R.K. Zahn

Korreferent: Professor Dr. K. Wezler

Tag der mündlichen Prüfung: 13. November 1965



I n h a l t s v e r z e i c h n i s

A) Einleitung

- 1) Aufgabe
- 2) Theorie der indirekten Autoxydation
- 3) Theorie der biologischen Oxydation durch sauerstoff-übertragende Fermente
- 4) Theorie der sauerstofflosen Oxydation durch Aktivierung des Wasserstoffes
- 5) Modelle
- 6) Cytochrome
 - a) Allgemeine Betrachtung
 - b) Hämochromogene
 - c) Einflüsse auf die Atmung werden auf Beeinflussung des Cytochromsystems zurückgeführt
 - d) Messung der Cytochrome in den Zellen
 - e) Spaltung des Cytochrom c; Häm;
 - f) Isolierung des Cyt. c
 - g) Eigenschaften des Cyt. c
 - h) Enzymeigenschaften des Cyt. c
 - i) Biologische Wirkungen des Cyt. c
 - k) Fragestellung

B) Methodik

- a) Verwendetes Tiermaterial
- b) Injektions-modus
- c) Aufbau der Schwimmgefäße
- d) Impulszähleinrichtung
- e) Kamera-Einrichtung
- f) Bestimmung des Schwimmgewichtes von Ratten
- g) Statistische Methoden

C) Ergebnisse

- a) Streuung
- b) Impulsmessung
- c) Kameraregistrierung
- d) Versuche bei 28°C ohne Wasserbewegung
- e) Versuche bei 35°C ohne Wasserbewegung
- f) Versuche bei 35°C mit Wasserbewegung
- g) Vergleich der Versuche e und f
- h) Differential-Analyse der vorstehenden Versuche
- i) Cyt. c-Strophantin-Wirkung auf die ermüdete Ratte
- k) Die Wirkung von Strophantin auf die ermüdete Ratte
- l) Die Wirkung von Cyt. c auf die ermüdete Ratte
- m) t-Test für k und l
- n) Schwimmgewichte von Ratten

D) Diskussion

E) Zusammenfassung

F) Literatur

G) Lebenslauf

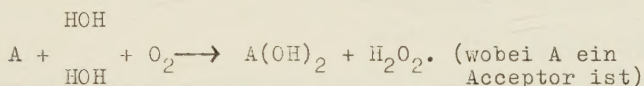
A) E i n l e i t u n g

1. Aufgabenstellung

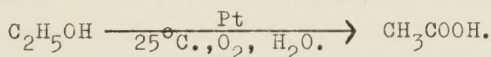
Die vorliegende Arbeit soll ein kritischer, experimenteller Beitrag über die Wirkung des Cytochroms c im tierischen Organismus sein. In Anlehnung an die Versuche von Hutschenreuter und Pitzler (89) soll sie der Klärung einiger nicht ganz durchschaubarer Faktoren dienen, da das Cytochrom c als Medikament in der Medizin angewendet wird.

M. Traube (1,2,5) beobachtete bei Metallen die Bildung von Hydroxyden unter Mitwirkung von Wasser. Aufgrund dieser Beobachtung schuf er die

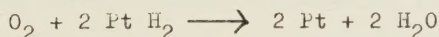
2. Theorie der indirekten Autoxydation



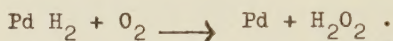
Er dehnte diese Theorie dann auf die Verbrennungsvorgänge in der lebenden Substanz aus. Davon nahm Wieland's (4). Theorie, die in ihrer ursprünglichen Fassung die Oxydation durch Dehydrierung beinhaltet, ihren Ausgang. Mit grundlegend dafür war das Modell von Edmund Davy (4).



Wieland gibt an, daß dies in folgender Weise vor sich gehe:

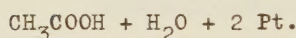
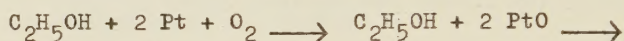


Er untersuchte den Teil des Modelles, der die Knallgasreaktion betrifft. Zunächst konnte er zeigen, daß sich ein Peroxyd bildete:



Durch Zugabe von HCN gelang es, die Ausbeute an H_2O_2 sogar noch um 60 % zu steigern. (25).

Warburg (13). vertritt die Meinung, daß in der Zelle das Metall den Sauerstoff überträgt und zwar in Form eines transitorischen Oxydes. Dabei entsteht dann kein Superoxyd.



Er stellte die

- 3) Theorie der biologischen Oxydation durch Sauerstoff übertragendes Eisen auf.

Das Warburgsche Fermenteisen ist durch die Hemmbarkeit der Aktivität durch Blausäure und Kohlenmonoxyd im Dunkeln gekennzeichnet. Bei Licht dagegen dissoziiert die Kohlenmonoxydverbindung. Das System wird so reaktiviert.

Dixon und Elliot bestätigen 1929 (24). die Befunde von Batelli und Stern, (85,29). wonach es eine durch Blausäure und Kohlenmonoxyd nicht hemmbare Atmung (Sauerstoffverbrauch) gibt, was der Warburgschen Theorie widersprach. Warburgs Schüler waren es dann selbst, die das eisenfreie gelbe Oxydationsferment isolierten.

- Durch Wandlung von Wieland's ursprünglicher Ansicht
4) entstand später die Theorie der sauerstofflosen Oxydation durch Aktivierung des Wasserstoffes, um ihn chemisch reaktionsfähig zu machen.

Dieser Anschauung ist bisher nie mit Erfolg widersprochen worden. Seit der Entdeckung des gelben Oxydationsfermentes, das autoxydabel ist und eine "Dehydrogenase" darstellt, ist an der Klassifizierung der Fermente erfolgreich gearbeitet worden. Heute teilt man sie ein in:

- 1) Cxytrophe Dehydrogenase. Sie können Wasserstoff auf Acceptoren und auf Sauerstoff übertragen.
- 2) Anoxytrophe Dehydrogenase. Sie sind nur in der Lage, den Wasserstoff auf Acceptoren und nicht auf Sauerstoff zu übertragen. Somit haben sie eine gewisse Acceptorspezifizität.

5) Die Beeinflussung der Lebensvorgänge

Claude Bernard entdeckte, daß die Gärung von Hefezellen in reversibler Weise gehemmt werden kann.

E. Overton fand, daß die Sauerstoff-Entwicklung belichteter Pflanzen durch Narkotika gehemmt werden kann.

O. Warburg entdeckte, daß die narkotische Halbwertkonzentration für Atmung und Gärung ungefähr in der gleichen Größenordnung sind, während bei der Alge Chlorella Atmung und Assimilation sich um eine Zehnerpotenz unterscheiden. (Phenylurethan).

Claude Bernard fand, daß die von ihm entdeckte Hemmung der Atmung durch Blausäure reversibel ist.

Bei einer physiologischen pH. und Temperatur ist das Cyanid undissoziiert (4). Der Partialdruck der Blausäure entspricht in Atü. ungefähr der Norm bei 20°C. (14). Z.B. entsprechen 1/1000 n ungefähr 1/1000 Atü. bei einer Wasserstoffionenkonzentration von 7,5. Blausäure läßt sich durch Hindurchleiten von Luft aus neutralen Lösungen leicht vollkommen austreiben. Außerdem bildet sie mit den gehemmten Fermenten eine dissoziabile Verbindung.

Bäckerhefe: Atemhemmung (50 %) $0,45 \times 10^{-5}$ M HCN

Gärungshemmung (50 %) $1,0 \times 10^{-2}$ M HCN

Bact. Coli: $\text{COOH} \longrightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$

Hemmung (50 %) $1,0 \times 10^{-5}$ M HCN

Die gelben Fermente werden durch Blausäure nicht gehemmt (Lösliche Atmung von Batelli und Stern, (24,25,26).

Bei der Sauerstoffübertragung des gelben Fermentes entsteht Wasserstoffsuperoxyd. Unter der Einwirkung von Blausäure werden die Peroxydasen und Katalasen gehemmt. Die Rückbildung des Sauerstoffes aus Wasserstoffsuperoxyd unterbleibt dann. Zum Ausgleich wird dann mehr Sauerstoff aus der Atmosphäre veratmet. Es steigt also bei der löslichen Atmung bei vollständiger Hemmung durch Blausäure der Sauerstoffverbrauch auf das Doppelte an. Bei Kartoffeln und Pilzen wird die lösliche Atmung durch die Anwesenheit von kupferhaltigen Fermenten ermöglicht (27), die durch Blausäure hemmbar ist.

Im Gegensatz zur Blausäure hemmt der Äthylester davon nicht:

- 1) die Atmung
- 2) die Gärung
- 3) die Kohlensäureassimilation

Trotzdem steigt die Gärung auf den anaeroben Wert.
(Positive Pasteur-Reaktion).

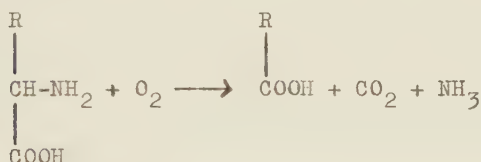
Schwefelwasserstoff hat die gleiche Wirkung und ungefähr die gleiche Wirkungsstärke wie Blausäure.

Bei der Hemmung mit diesen beiden Stoffen handelt es sich um eine chemische Antikatalyse.

Die Wirkungshemmungen sind im Gegensatz zur Narkose spezifisch, bei der sie nach der Regel der homologen Reihe erfolgt.

5) Modelle

O. Warburg fand 1921 (14,15,16), daß Aminosäuren, die an Blutkohle adsorbiert waren, bei Zimmertemperatur und neutraler Reaktion vom molekularem Sauerstoff adsorbiert werden. Dabei werden im allgemeinen pro Mol Aminosäure ein Mol Sauerstoff verbraucht, wobei ein Mol Kohlendioxyd und ein Mol Ammoniak entstehen.

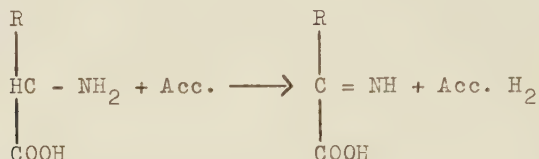


Bei der Hemmung durch Verdrängung der Narkotika (molarer Platzbedarf) verhindert ein adsorbiertes Blausäuremolekül die Oxydation von 70 Aminosäuremolekülen. (spezifische Hemmung).

Es besteht die Annahme des Vorhandenseins sogenannter aktiver Bezirke (24,32), die allerdings die Erklärung der narkotischen Hemmung erschweren. Dabei bleibt die Frage unbeantwortet, ob die aktiven Bezirke gehemmt werden oder ob die gesamte Oberfläche besetzt wird.

Die aktiven Bezirke bestehen aus Eisen, welches an Stickstoff gebunden ist, was durch Synthese von Warburg (13) bestätigt werden konnte.

Im Jahre 1924 stellte H. Wieland (6) für die Oxydation von Aminosäuren an Blutkohle folgende Formel auf:



Auch damit wurde die Frage der spezifischen Hemmbarkeit nicht geklärt. Das gilt auch für den Fall, daß der "Katalysator selbst der Wasserstoffacceptor ist", wie in dem Falle der "Dehydrierung" von Equilin zu Equilenin mit Palladium. (28) Außerdem bleibt die Frage nach dem Druck des bei der Reaktion beteiligten Wasserstoffes unbeantwortet. Sie erscheint interessant, nachdem Gillespie und Liu (29) gezeigt haben, daß im Chinhydron-Hydrochinonsystem, das durch Palladium dehydriert werden sollte, der Wasserstoffpartialdruck 10^{-24} Atü. beträgt.

Cystein:

Cystein bildet in wässriger Lösung mit dreiwertigem Eisen einen violetten Komplex, der im Stehen entfärbt wird.

$\text{Cystein} + \text{Fe}^{+++} \longrightarrow (\text{Cystein Fe}^{+++})$ (violett verfärbt) $\longrightarrow \text{Cystin} + \text{Fe}^{++}$. Aus Cystein wurde so durch Oxydation Cystin. (Das Eisen übernimmt dabei die Rolle des Elektronenüberträgers). Diese Oxydation ist durch Blausäure und Pyrophosphat hemmbar, die beide innigere Komplexe als Cystein mit dem Eisen zu bilden vermögen. (12).

Auf diese Oxydation von Cystein wurde eine Methode zur Bestimmung von Eisen, Kupfer und Mangan gegründet, da alle diese Schwermetallkomplexe der Aminosäuren ihre Oxydation bewirken (9).

Eisenpyrophosphat kann Sauerstoff auf Kohlehydrate übertragen (30). Kupferpyrophosphat katalysiert die Cysteinoxydation durch Sauerstoff. (9).

Glutathion:

Ein Tripeptid aus den drei Aminosäuren Glykokoll, Cystein und Glutaminsäure, das 1922 von Hopkins entdeckt wurde, ist durch Eisenverunreinigungen autoxydabel (39).

Sulfide:

H. Krebs fand, daß eine Natriumsulfidlösung, die 100 ml Sauerstoff verbraucht hatte, 10^{-9} g Mangan enthielt. (41). (Auch diese Methode kann zur Schwermetallbestimmung herangezogen werden).

Kohlenhydrate:

Sie sind in Salzlösungen durch Sauerstoff oxydierbar. Auch hier handelt es sich um Eisenkatalyse. (40).

Weinsäure:

Dihydro-oxymaleinsäure wird in Anwesenheit von Eisensulfat durch molekularen Sauerstoff oxydiert. (21).

Harnsäure:

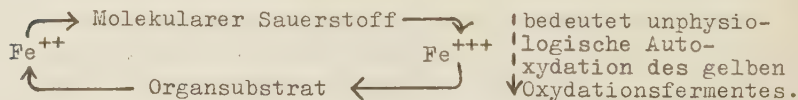
1952 entdeckte M. Griffiths, daß Harnsäure bei alkalischem pH. in Gegenwart katalytischer Mengen von Kupfer durch molekularen Sauerstoff oxydiert wird. Dabei ist eine Inhibition durch Blausäure, nicht aber durch Pyrophosphat möglich.

Die Aktivierungsenergie des Komplexes Kupfer-Harnsäure-Sauerstoff beträgt 16.950 cal/Mol. Im charakteristischen Ultraviolettpektrum spielt sich bei dieser Harnsäureoxydation das Gleiche ab wie bei der Wirkung der Urikase. Unter physiologischen pH-Verhältnissen erfolgt Oxydation im System: Cyt.Oxydase $\longrightarrow$ Cyt.C. $\longrightarrow$ Harnsäure. Griffiths nimmt an, daß in der Zelle, in der Urikase fehlt, die Harnsäure nach diesem Mechanismus oxydiert werden kann.

Alle diese Oxydationen sind durch Blausäure hemmbar. Dieses Verhalten gilt jedoch nicht allgemein für Fermente wie zum Beispiel für das proteinspaltende Ferment Papain, welches durch Blausäure aktiviert wird (45). Krebs (42,43) fand, daß die Wirkung von Papain durch Spuren von Schwermetallsalzen bereits erheblich gehemmt wird. Andererseits hebt der Zusatz von Blausäure oder Pyrophosphat die Wirkung der Schwermetalle wieder auf.

- 6) Anti-Oxygene stellen Substanzen dar, die im Sinne der Narkotika eine Hemmung erzielen. (46).

Auf den bisher geschilderten Befunden baut Warburg seine Oxydationstheorie auf. Danach ist das Eisen in der Zelle physiologischerweise der einzige autoxydable Bestandteil. (10). Dies bedeutet aber gleichzeitig, daß die Autoxydation des gelben Oxydationsfermentes unphysiologisch ist.



Ausnahmen bilden die kupferhaltigen Proteine der Octopoden, der Kartoffeln und der Pilze. Das gleiche gilt für ein vanadiumhaltiges Protein im Blut der Ascidien. (Bielig)

Das Eisen muß komplex gebunden sein. Eisen-2-Ionen sind nicht autoxydabel und können daher auch den Sauerstoff nicht übertragen.

Eisenhydroxyd ist autoxydabel. Allerdings verbindet es sich mit der Blausäure so innig, daß die Komplexbildung irreversibel bleibt. Also muß die Blausäure sich offenbar mit dem dreiwertigen Eisen verbinden (8). Die Hemmungswirkung auf das Fermenteisen wurde als unabhängig vom Sauerstoffdruck nachgewiesen. Bei der Komplexbildung des zweiwertigen Eisens müßte eine Konkurrenz zwischen dem Sauerstoff und der Blausäure bestehen.

Bei der Katalyse des Eisens gibt es verschiedene Möglichkeiten. (47)

Sie kann

bei Häminkohle mit Eisen und im Cysteineisen durch C_2H_5CN gehemmt werden. Bei der Zellatmung und der Leberkatalase ist sie durch C_2H_5CN nicht hemmbar.

6) Die Cytochrome

- a) Mc.Munn (48) entdeckte 1858 durch spektroskopische Beobachtungen, daß es in den Zellen oxydierbare und reduzierbare Hämine gibt.

Hoppe-Seiler und Mitarbeiter behaupteten damals, daß es sich dabei um Zersetzungsprodukte des Hämoglobins handele.

Demgegenüber weist Mc.Munn daraufhin, daß es Tiere ohne Hämoglobin gäbe, bei denen gerade die Konzentration dieser Hämie besonders hoch sei (48).

H. Fischer bestätigte später Mc.Munns Befunde (54). Bei der Porphyrinurie wird ein "Koproporphyrin" I mit Harn und Kot ausgeschieden, das nicht aus dem Protoporphyrin des Hämoglobins stammen kann.

(53,54,55)

H. Fischer kam mit der Theorie vom "Dualismus der Porphyrine" (49,50,51,52). D. Keillin bestätigte dann mit genaueren Nachuntersuchungen Mc. Munns Versuche. (65,66,67,68). Sein Verdienst war die Übertragung der Hemmungstechnik auf dieses Fermentgebiet. Bedauerlicherweise führte er neue Namen ein, indem er Mc.Munns Histohämatin mit Cytochrom bezeichnete.

1931 entdeckte Warburg die Hauptbanden der Cytochrome. (16,17). Diejenigen von Mc.Munn waren die im langwelligen Bereich gelegenen Nebendanden.

Kellin und Hartree ordneten die Bande 449 dem Sauerstoffferment zu.

Tabelle 1

Die von Keillin und Hartree gefundenen Cytochrom-Banden

	Cyt. a.	Cyt. b.	Cyt. c.
1. Nebendanden	605	567	550
2. Nebendanden	?	?	522
Hauptbanden	499	433	417

Diese Zahlen gelten für den reduzierten Zustand.

- b) Anson und Mirsky (56,57,58). konnten zeigen, daß Verbindungen von Ferroporphyrinen mit Stickstoffhaltigen Basen scharfe Lichtabsorptionsbanden bilden, die den Namen Hämochromogene führen.

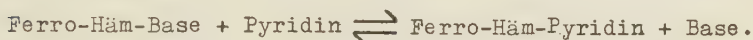


Die Ferro-Häme (Ferroporphyrine) zeigen keine charakteristischen Banden. Die Lage der Hämochromogen-Banden hängt 1. vom Häm und 2. von der Base ab.

Wegen der Dissoziierbarkeit der Chromogene ergeben sich zwei Variationsmöglichkeiten:

- 1) an einer Base werden die Hämine variiert.
- 2) an einem Häm werden die Basen variiert.

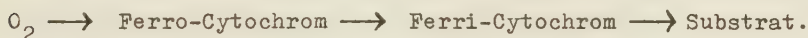
Die gegenseitigen Verdrängungen hängen von der jeweiligen Dissoziation ab. In den meisten Fällen gelingt es leicht, die natürliche Base durch Pyridin zu verdrängen.



Anson und Mirsky gelang der Beweis der Identität des Häms von Cytochrom c und dem des b. Man nannte es Protohäm (59). Verschieden sind nur die dazugehörigen Basen. Cytochrom a besitzt ein mischfarbendes Hämin (19). Falk und Rimington isolierten ein Häm a, das sehr instabil in saurer Lösung ist. (60).

- c) D. Keillin fand völligen Parallelismus bezüglich der Hemmbarkeit von Hefezellen und dem Verhalten des Cytochrom-Systems, soweit es spektroskopisch beobachtbar war.

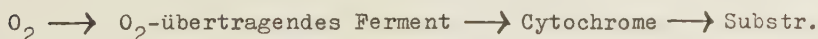
Schematisch sieht das dann folgendermaßen aus:



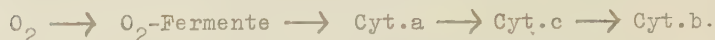
Außerdem beobachtete er, daß Blausäure bei gut-durchlüfteter Hefe die Sauerstoffaufnahme blockierte und daß danach im Laufe der Zeit Reduktion eines Teiles des Cytochromes eintrat. (65,66,67,68).

O. Warburg fand, (10,11) daß Kohlenmonoxyd ebenfalls die Atmung blockiert, ohne daß daraus ein Zusammenhang mit den Banden des Cytochrom c zu erkennen war.

Daraus schloß er (22) :



G.E. Ball untersuchte die Reihenfolge der Cytochrome (61). Sein Schluß:



scheint den Tatsachen zu entsprechen, falls keine besonderen Umstände herrschen (20).

- d) E. Haas mißt im Differentialexperiment die Cytochrom-Reduktion (60): Zwei Küvetten, die mit Sauerstoff durchperlte Hefesuspension enthalten, werden spectrophotometrisch gemessen.

Zu der ersten wird eine kleine, bekannte Menge z.B. reduziertes Cytochrom c gegeben. Sie soll nicht oxydiert werden.

Zu der zweiten wird Blausäure gegeben.

Danach wird in beiden die Cytochrom-c-Reduktionszeit gemessen. Das erste dient zur Bestimmung des Cytochrom c in den Zellen. Dabei werden k Mole Cytochrom c pro Minute reduziert. Ebenso werden l Mole Sauerstoff pro Minute verbraucht.

Daraus ergibt sich die Proportion:

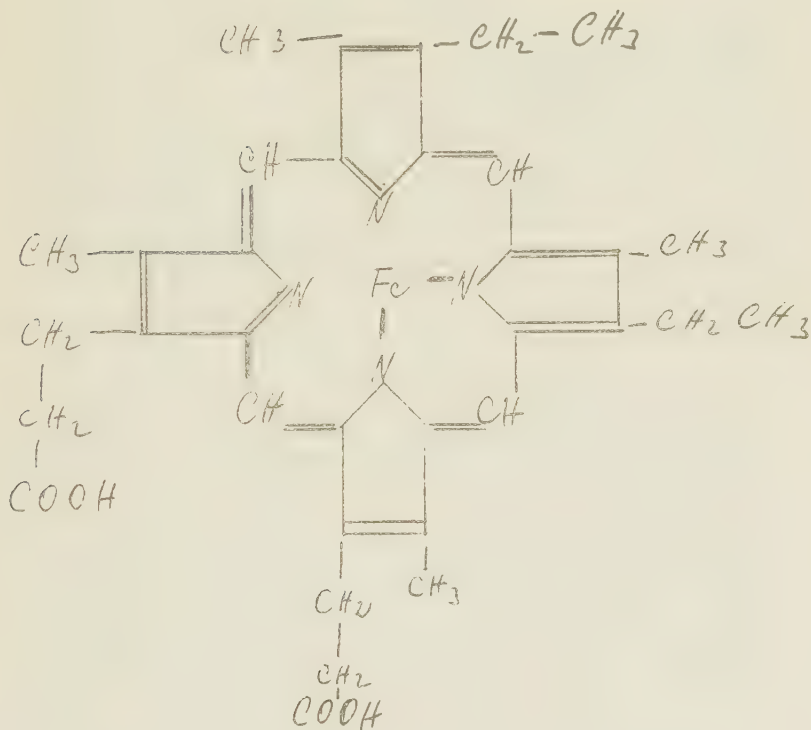
$k : l = 4 : 1$, so daß 4 Mole Cytochrom c von einem Mol Sauerstoff oxydiert werden.

Es ist gelungen, diese Gleichung zu bestätigen, und damit ist dann auch bewiesen, daß alle Atmung über das Cytochrom c-System funktioniert.

- e) Bisher ist es nicht möglich, das Molekül des Cyt. c reversibel zu spalten wie das des Hämoglobins. Nach Theorell sind Häm in und Protein durch zwei feste Brücken miteinander verbunden, wobei zwei Cysteinreste an die beiden Vinylgruppen des Hämins gehängt sind, wodurch Thio-Ätherbrücken entstehen. Bei milder Säurehydrolyse wird das Di-Cystein-Addukt des Protoporphyrins abgespalten. Bei stärkerer Säurehydrolyse erhält man Hämatoporphyrin.

Heute geben wir die Formel des Häm des Cytochroms c
wie folgt an:

Abb.: 1 Cytohäam



Cyt. c lässt sich ziemlich leicht extrahieren und reinigen. Es werden sogar Präparate aus der Muskulatur des Königspinguins, aus Fischleber, aus Rinder- und Schweineherzen sowie aus Bäckerhefe kristallisiert. Als günstigstes Extraktionsmittel hat sich eine Lösung von 2 Litern Phosphat-Puffer von 0,15 mol und einem pH von 7,3 erwiesen, das man auf 150 g Substrat etwa 2 bis 12 Stunden bei einer Temperatur unter 25 Grad einwirken lässt.

Theorell (33,34,36) und Keillin (69) gewannen es aus Herzmuskulatur. Aus einer Menge von 1200 Herzen ließen sich 180 g Cyt. c extrahieren, das entspricht einer Ausbeute von ungefähr 150 mg/kg bei einem Eisengehalt von 0,34 %. Dabei errechnet sich ein Molekulargewicht von 16 000 (Ulze berichtet von 15 600). Beim Cyt. c aus der Hefe hatte sich ein Molekulargewicht von 18 000, allerdings bei einem Feuchtigkeitsgehalt von 10 - 12 % herausgestellt. (72,73,37). Theorell und auch Keillin haben dann das Cyt. c noch weiter gereinigt und kamen bei einem Eisengehalt von 0,43 % zu einem Molekulargewicht von 13 000. Theorell gebührt das Verdienst der Analyse des reinen Produktes. (37).

Nach Ansicht der Autoren geht mit der Reinigung kein Verlust der Aktivität einher, das heißt, die Enzymaktivität pro mol Eisen bleibt konstant. Möglicherweise dient das "inerte" Protein dazu, das Fermentmolekül an der richtigen Stelle in der Zelle einzupassen, was sich mit Adapterfunktion bezeichnen ließe.

Nach Keillin (68) ist das Cyt. c von allen Komponenten der unempfindlichste Teil im Elektronen-Transmittersystem gegen Temperatur und die verschiedensten Reagentien. Aus getrockneter Hefe, ja sogar aus Acetonhefe kann es extrahiert werden. Im Extrakt verhält es sich wie in der lebenden Zelle. Am besten lässt es sich mit einer Lösung von Natrium-Bisulfit und aus diesem Extrakt in Gegenwart von Calcium-Chlorid durch Hindurchleiten von Schwefel-Dioxyd ausfällen.

Ein Teil des Cyt. c, der nicht oxydiert ist, verbleibt im Überstand und kommt erst nach seiner restlosen Oxydation zu Boden, eventuell zusammen mit anderen Proteinen. Das Schwefeldioxyd und die Salze lassen sich aus dem Niederschlag durch wiederholtes Waschen mit destilliertem Wasser entfernen.

Fujita (77) gibt die Extraktion im sauren Medium aus dem Gewebe an. Er empfiehlt Schwefelsäure. Durch eine Nachbehandlung mit 25 %-iger Amoniumsulfatlösung über 10 Minuten bei einer Temperatur von 55 Grad c. gelingt nach seiner Ansicht mühelos die Abtrennung des Hämoglobins. Danach erfolgt das Ausschütteln mit Aceton bei Zimmertemperatur.

Die Bestimmung erfolgt nach der Formel:

$E_{\text{Cyt.c red.}} \text{ minus } E_{\text{Cyt.c oxyd.}} \text{ entspricht } \text{Conc. Cyt.c.}$

Dazu wird es so alkalisch gemacht, bis Autoxydation eintritt und dann die Extinktion abgelesen. Danach wird dann bei gleichem pH mit Hydrosulfit reduziert. Die Extraktion beim Einzeller ist nach seiner Ansicht sehr schwierig.

Stotz (78) bestimmt das Cyt. c manometrisch durch Messung der Sauerstoff-Aufnahme mit Hilfe von Hydrochinon und Cyt.-Oxydase.

g) Eigenschaften des Cyt. c

Schon bei der Darstellung kommt der Verdacht auf, daß das Cyt. c offenbar in zwei Formen vorliegt: einer leicht extrahierbaren und einer schwer zugänglichen, die sich erst in die andere umwandelt durch sekundäre Veränderung an den subzellulären Elementen der Zelle. Vermutlich ist die schwerzugängliche Form ein Lipid-Komplex des Cyt. c. (84)

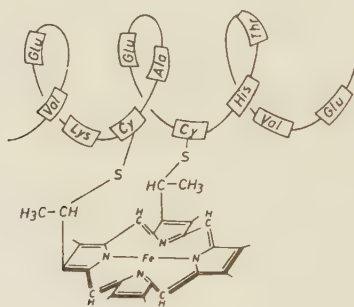
Keillin (68) wies 1930 erstmals darauf hin, daß sich das extrahierte Cyt. c anders - nämlich wie exogenes - verhält, als das in der Zelle befindliche.

Die Cytochrome aller Organismen sind basische Proteine, die der Säugetiere sogar stark basische mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 10,65. Dies rührt vom hohen Gehalt an basischen Aminosäuren her.

Die Abb. 2 zeigt einen Ausschnitt aus einem Cyt. c Molekül und zwar nach unserer heutigen Vorstellung den die prosthetische Gruppe tragenden Abschnitt.

Abb.: 2

Ausschnitt aus der Polypeptidkette des Cyt. c mit prosthetischer Gruppe. (nach Karlson)



Zwei Imidazolgruppen von Histidinen besetzen zwei von den sechs Koordinationsbindungen des an vier Porphyrin-Stickstoffatome weiter gebundenen Eisens. Dadurch unterscheidet sich die Reaktionsfähigkeit dieses Fermenteisens von dem des Hämoglobins, bei dem nur vier Koordinationspunkte festgelegt sind; und anders als dieses kann das native Cyt. c daher nicht direkt mit Sauerstoff und Kohlenmonoxyd reagieren.

Autoxydabilität oder Kombination mit Kohlenmonoxyd sind bei Cyt. c-Präparaten daher Zeichen für Denaturierung.

Das native Cyt. c läßt sich zur Ferroform reduzieren z.B. durch p-Phenylendiamin, Cystein, Ascorbinsäure, Catechol etc.

Über und unterhalb von einem pH von 4 bis 13 ist es autoxydabel. Im stark alkalischen Bereich reagiert es mit Kohlenmonoxyd. Im leicht sauren und alkalischen Bereich ist es stabil, und läßt sich selbst durch Bakterien nicht zerstören. Reduziertes Cyt. c wird weder durch Eisensalze noch durch Hämine oxydiert; dagegen recht leicht durch Wasserstoff-Superoxyd und rotes Blutlaugensalz $K_3(FeCN)_6$.

Das neutralisierte, oxydierte Cyt. c zeigt im Spektrum eine Absorption nach dem Hämatin-Typ, das reduzierte eine solche vom Hämochromogen-Typ.

Das Oxydations-Reduktions-Potential des Cyt. c wurde über einen weiten pH-Bereich bestimmt. Paul (84), Rodkay und Ball (85). Die Dissoziationskonstante des Ferri-Cytochrom c wird von Paul bei pH 6,86 und von Rodkay und Ball bei pH 7,70 angegeben.

Das Redoxpotential des Cyt. c liegt im Bereich von pH 2-8 konstant bei $E + 0,26$ bei einer Temperatur von $30^{\circ} C.$, ein erstaunlicher und bedeutungsvoller Befund.

h) Die enzymatischen Eigenschaften des Cyt. c.

Nach der heute am weitesten verbreiteten Meinung gehört das Cyt. c zu dem Elektronentransmittersystem. Es ist ein Teil der Enzymkette, die vorwiegend oder doch wenigstens zu einem wichtigen Teil aus Cytochromen besteht. Der von den Reduktasen aus dem Substrat im Citronensäurezyklus oder auf dem Wege der Glykolyse oder an anderer Stelle extrahierte Wasserstoff wird seiner Elektronen beraubt.

Diese fließen über das Elektronentransmittersystem dem Sauerstoff, der z.B. via Oxyhämoglobin an die Zellgrenze herangeführt, zu und führen ihn in Sauerstoffanionen über, die nun mit dem aus dem Substratwasserstoff gebildeten Protonen zu Wasser reagieren. Diese, sich in Stufen vollziehenden Übergänge gewährleisten, daß kein gefährliches Wasserstoffsuperoxyd gebildet wird und daß in verschiedenen Stufen in noch unbekannter Weise die Energie als Hochenergiephosphat z.B. bei den höheren Organismen als Adenosintriphosphat gewonnen werden kann.

Auf ihrem Wege müssen wahrscheinlich alle Elektronen über das Cyt. c laufen. Auf der Seite der Elektronenlieferung gibt es eine Fülle von Enzymen, so daß hier eine Angebotsmenge herrschen kann, soweit man die enzymatische Kapazität unter Außerachtlassung von Regelphänomenen betrachtet. Das Gleiche läßt sich auch von der Elektronenabgabeseite sagen, wo die Cytochromoxydase in sehr großer Menge mit einer sehr hohen Wechselzahl die Elektronen dem Sauerstoff zu-leitet. Somit wird das Cyt. c unter Umständen zur Engstelle. Die Enzymatische Aktivität des Cyt. c läßt sich entsprechend seiner Stellung daher auch nach zwei Richtungen prüfen: Einmal mittels Cytochrom-Oxydase-Präparationen (70,82), zum anderen mittels Reduktase-Präparationen, wie Cyt. c-DPN- oder Cyt. c-TPN - Reduktase. (85,86)

Biologische Wirkung des Cyt. c.

Es ist nicht ganz sicher, ob die enzymatischen Tests wirklich die Eigenschaften des Cyt. c erfassen, die in der Natur seine spezifische Wirkung ausmachen. Den Mediziner würde daher der Nachweis für die Parallelität von enzymatischer und biologischer Wirkung interessieren, von welcher Stelle an er die Überlegungen des Biochemikers 'nutzen' könnte.

Ebenso könnte ein biologischer Test aber auch helfen, wertvolle neue Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus des Cyt. c zu vermitteln. Die Frage objektiv nachweisbarer biologischer Cyt. c-Wirkungen ist daher höchst aktuell.

Eine Wirkung des Cyt. c fand E. Klar (90) am winterschlafenden Igel. Wahrscheinlich handelt es sich um eine ursächliche Wirkung, von der Klar annimmt, daß es sich um eine Blockade des Cyt. c durch ein Abbauprodukt des braunen Fettgewebes handelt.

Michel und Scheinberg (91), die Cyt. c, offenbar tierischen Ursprunges, anoxämischen und mit Cyanid vergifteten Ratten i.v. injizierten, konnten keine Rettung der Tiere erreichen. Proger und Mitarbeiter (92) hatten jedoch das Gegenteil behauptet. Albaum und Mitarbeitern gelang es, zu zeigen, daß nach Cyanvergiftung nur noch 50 % der Cyt. c-Oxydase des Rattengehirns funktionstüchtig sind. Danach hätte es sehr wohl einen Sinn, den Engpaß Cyt. c durch i.v.-Gaben zu erweitern. Allerdings gelang es nicht, die Lebenserwartung der Ratten zu erhöhen. Es zeigte sich keinerlei Effekt an den Mechanismen der Vergiftung, wie Senkung des Gewebspyrophosphats oder Anstieg des Blutlactates.

Ammon und Werth (93) (94) verwendeten die Rettung malachitgrünvergifteter Tiere durch Cyt. c als Test. Dabei erscheint es nach unserer Ansicht fraglich, ob die Elektronentransmittereigenschaft des Cyt. c damit geprüft wird, oder ob das basische Protein in Konkurrenz mit dem basischen Farbstoff an Rezeptorstelle mit den Nucleinsäuren tritt. Für unsere Ansicht sprechen die unter Malachitgrün beobachteten Erbveränderungen. Einen wesentlich stärker auf die enzymatische Funktion gerichteten basischen Test haben Wetzler und Schäfer entwickelt.

Zu ihren Versuchen benutzten sie Herzen von Fröschen (*Rana aesculenta*), die sie isoliert in einer physiologischen Lösung schlagen ließen. Um sie belasten zu können, banden sie in die Aorta ein Glasröhrchen, das sie beliebig bis zu einer Höhe von 50 cm mit der Lösung füllen konnten. Bei einer Temperatur von 18°C ließen sie die Herzen erst eine Weile ermüden. Danach bestimmten sie vergleichend mit und ohne Cyt. c die Frequenz und das Schlagvolumen. Technisch gelang das mit einer Gummimembran, die entsprechend der Frequenz und der Volumensänderung des Herzens schwankte. Ein kleines Spiegelchen, das auf der Membran befestigt war, reflektierte einen Lichtstrahl, dessen Schwankungen photographisch fixiert werden konnten. Auf diese Weise war es möglich, bei schwankender Belastung die objektive Leistungsfähigkeit der Herzen vergleichend zu messen.

Dabei zeigte sich im Durchschnitt der Versuche eine signifikante Steigerung der Leistung bei den Herzen, bei denen Cyt. c der Durchströmungslösung beigegeben worden war.

Darüberhinaus haben noch Hutschenreuter und Fitzler (89) einen Rattentest veröffentlicht, der am Ganztier die Reaktion gegenüber dem Cyt. c zu klären versprach. Dabei werden Ratten je 4,5 mg Cyt. c und 0,375 mg Strophantin in die Schwanzvene injiziert. Die Tiere haben vorher gefastet. Dann werden sie in große Tonnen mit Wasser geworfen, wo sie bei 28°C bis zur völligen Erschöpfung schwimmen. Die Autoren haben dabei mit 2 x 20 Tieren gearbeitet. Die Schwimdauer der Tiere ist im nachfolgenden Diagramm gegen die Häufigkeit, mit der sie beobachtet werden konnten, aufgetragen.

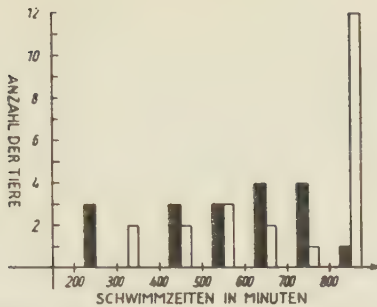


Abb. 3: Erschöpfungs- bzw. Schwimmzeiten der einzelnen Tiere (weiße Kolonnen — Cytodrom-c-Strophanthin-Tiere, schwarze Kolonnen — Kontrolltiere)

- i) Dabei fällt auf, daß bei den Cyt. c-Tieren alle bis auf die in einer Klasse vereinigten kürzer schwammen als die Kontrolltiere. Die in dieser letzten Klasse vereinigten Tiere haben Schwimmzeiten erreicht, die weit jenseits der Kontrollzeiten liegen. Insgesamt ist die mittlere Schwimmzeit aller mit Cyt. e-Strophanthin behandelten Tiere signifikant höher (t-Test) als die der Kontrollen.

Von Hutschenreuter und Pitzler ist dieser Befund als ein Effekt des Cyt. c auf Herz und Kreislauf gedeutet worden, deren Dynamik so beeinflusst wurde, daß ein längeres Durchhalten möglich war. Die Form des Schwimmzeit-Häufigkeits-Diagramms wirft jedoch einige Fragen auf:

k) Art der Fragestellung

- 1) Gelingt es, die Versuche mit unserem Tiermaterial zu wiederholen, oder betrifft das nur einen besonderen Stamm ?
- 2) Haben die so viel länger schwimmenden Tiere besondere Fähigkeiten oder Eigenschaften gegenüber den anderen ihrer Gruppe ?
- 3) Welches ist der eigentlich wirksame Stoff: das Cyt. c oder das Strophanthin ?
- 4) Ist der Schwimmversuch auf eine Herz-Kreislauf- oder eine ganz andere Wirkung eines der beiden Stoffe abgestellt ?

B) M e t h o d i k

Für die Versuche mit nicht ermüdeten Tieren wurden untrainierte, mit Standardkost (Altromin der Fa. Altrogge) ad libidum gefütterte, weiße, männliche Ratten von $150 \pm 15g$ Gewicht des Stammes Burgmeier verwendet. (Fa. Burgmeier Ffm. Sindlingen). Für die Versuche (Ergebnisse d und e) verwendete ich weiße männliche NMR I Ratten der Anstalt für Versuchstierzucht Hannover von $150 \pm 5g$ Gewicht.

Diese Tiere wurden wie oben gehalten.

Für alle weiteren Versuche wurden Haubenratten (ebenfalls Anstalt für Versuchstierzucht Hannover) mit einem Gewicht von $150 \pm 8g$ verwendet.

Alle Tiere wurden vor Versuchsbeginn mindestens eine Woche bei uns gehalten und auf Gewichtsveränderung, eventuelle Erkrankungen und abweichende Verhaltensweise beobachtet.

Die Applikation der Pharmake erfolgte mit einer 22-er Kanüle in eine Schwanzvene. Jedes der Tiere wurde nur einmal in Versuch genommen.

Als Cytochrom wurde Cyto-Mack (Fa. Mack, Illertissen) verwendet.

Die Versuchstiere erhielten entweder 4,5mg Cyt.c oder 0,377mg Strophantin oder 4,5mg Cyt.c + 0,377mg Strophantin in 2,5 ml 0,9% NaCl mit einer ph von 7,4. Die Kontrolltiere bekamen 2,5 ml physiologischer NaCl-Lösung gespritzt. Die Injektion erfolgte langsam über 10 min. Die Temperatur der Lösungen betrug $37^{\circ}C$. Nach der Injektion wurden die Tiere für 15 min warm und ruhig gehalten. Danach wurden sie langsam und getrennt in die gefüllten Schwimmbehälter gegeben.

- c) Diese Versuchsanordnung bestand aus zwei Polyäthylenfässern A_1 , A_2 von je 150 Litern Inhalt und einem

kleineren ^B von etwa 10 Litern. An ihren tiefsten Stellen waren alle drei mit Schläuchen von 30 mm Lumen verbunden. Daneben besaßen die beiden großen je einen Anschluß von etwa 10 mm Durchmesser, die über ein T-Stück ^C zu einer Umwälzpumpe ^D und von dieser in den oberen Teil des kleinen Gefäßes mündeten ^E. Darin befanden sich ein Tauchsieder ^G von 2 KVA, der sich von einem Regelthermometer ^H über ein Relais ^F schalten ließ.

Die Umwälzung funktionierte in der Weise, daß das Wasser aus den großen Gefäßen ^A, in denen die Ratten schwammen, durch die Pumpe in das etwas höher gehängte kleinere ^B befördert wurde, aus dem es erwärmt und durch ein Sieb von den festen Verunreinigungen (Rattenexkrementen) gereinigt nach dem Gesetz der kommunizierenden Röhren durch die starken Schläuche wieder in die Schwimmgefäße gelangen konnte. Die zwei Ansaugstutzen vor dem T-Stutzen waren mit zwei Schraubklemmen armiert ^I₁, ^I₂, um etwa auftretende Temperaturdifferenzen, die durch verschiedene Strömungswiderstände im Schlauchsystem entstehen, ausgleichen zu können. Die Gefäße waren etwa zu drei Vierteln gefüllt, nachdem sich herausgestellt hatte, daß es wiederholt Ratten gelungen war, unterzutauchen, sich vom Boden abzustoßen und im Sprung durch das Wasser den Gefäßrand zu erreichen. Bei jedem Versuch wurde jeweils das Gefäß des Versuchstieres mit dem des Kontrolltieres vertauscht, um mögliche kleinere Fehlerquellen durch minimale Temperaturunterschiede, andere Lichtverhältnisse oder Abweichungen der Strömungsverhältnisse des Wassers auszugleichen.

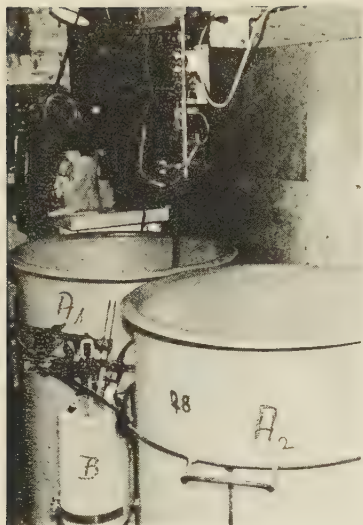


Abb.: 4

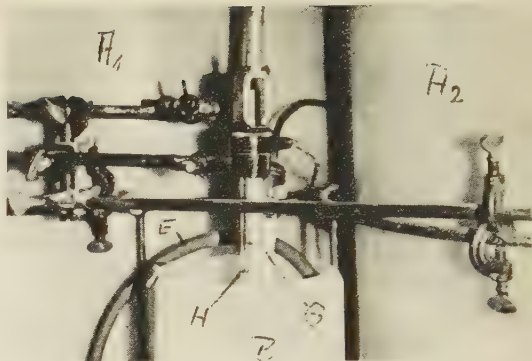


Abb.: 5

Abb.: 4

Gesamtansicht der Versuchseinrichtung

Abb.: 5

Schaltthermometer und Tauchsieder

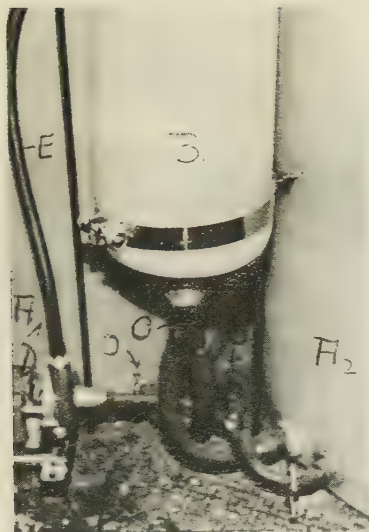


Abb.: 6

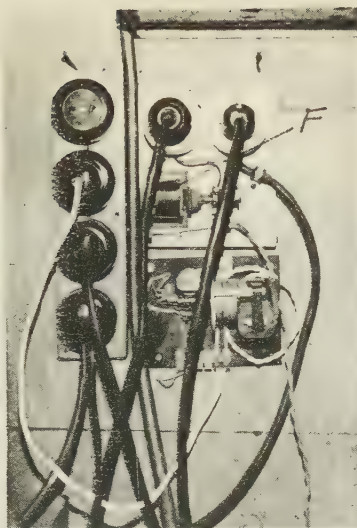


Abb.: 7



Abb.: 8

Abb.: 6

Schlauchsystern mit Pumpe

Abb.: 7

Zeitschalter für die Kamera
und Relais für Tauchsieder

Abb.: 8

Kleines Gefäß von oben

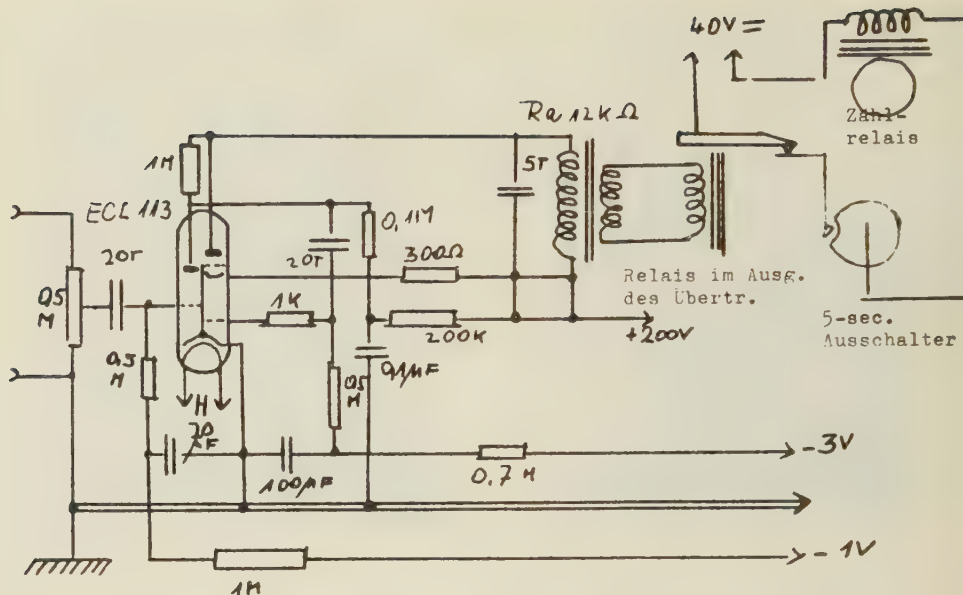


Abb.: 9

Schaltbild der Sekunden-Zähleinrichtung
(vereinfacht)

zum Eingang

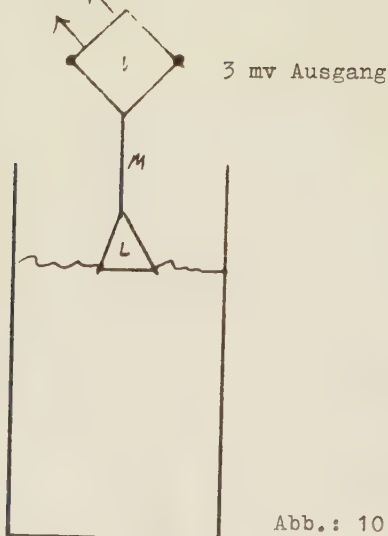


Abb.: 10 Schematische Anordnung
des Impulsgebers im Schwimmgefäß

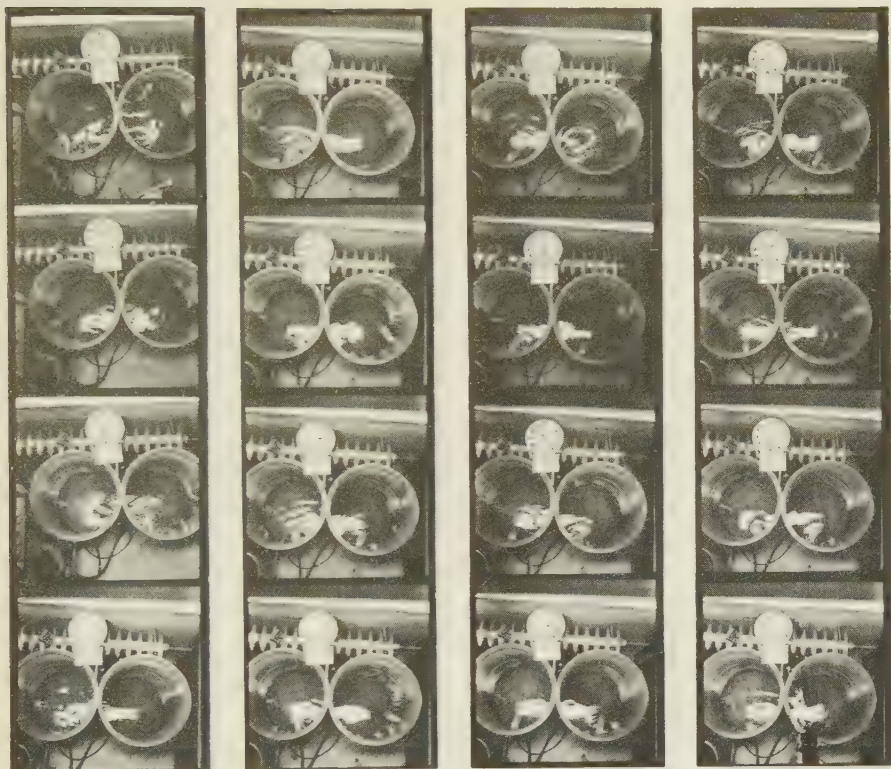
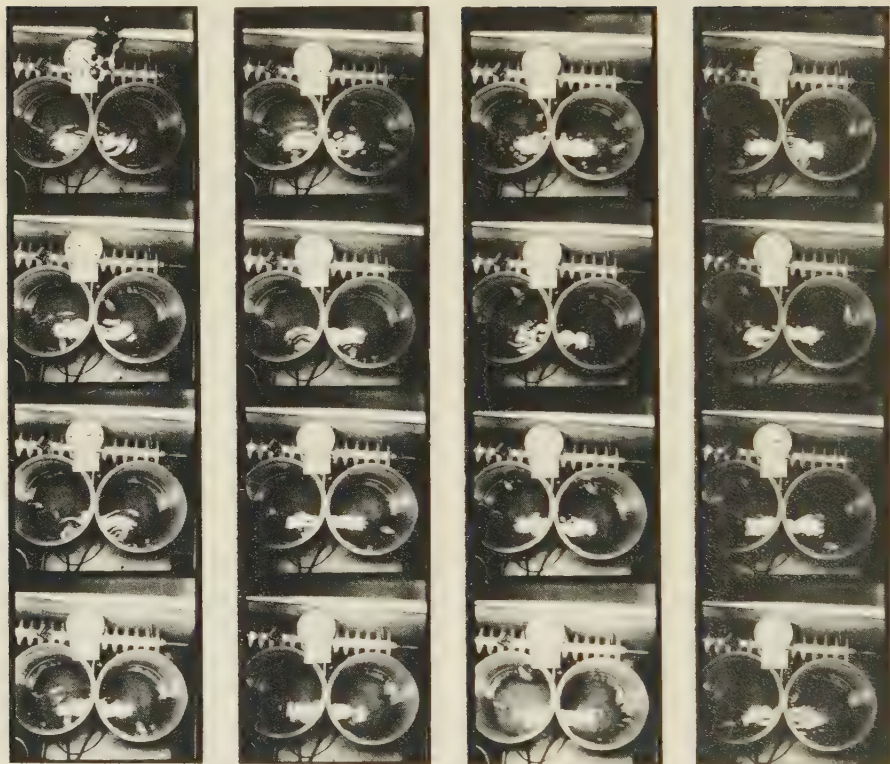


Abb. 11

Fortsetzung umseitig

Fortsetzung Abb. 11



Die Schwimmdauer der Tiere haben wir auf zweierlei Weise bewertet:

1) mit einer Impulsbewertung und 2) mit photographischer Registrierung.

Es hatte sich gleich zu Anfang herausgestellt, daß die individuelle Schwimmdauer nicht angenähert voraussagen und damit der voraussichtliche Ablesezeitpunkt nicht zu schätzen ist. Eine subjektive Bestimmung schied also aus, und es mußte automatisch registriert werden. Dazu wurde in jedes Schwimmgefäß ein leerer Erlenmeyerkolben (L) von 250 ml gehängt. Mit einem Draht hing er an einem piezoelektrischen Tonabnehmer (Schallplattenindustrie), der in seiner Höhe so einstellbar war, daß der Auftrieb des Kolbens den Zug an der Aufhängung gerade entlastete. Die Wasserumwälzung in den Gefäßen war so bemessen, daß in den Schwimmgefäßen keine Oberflächenwirbel entstanden.

Bei geringster Wellenbewegung, etwa durch Schwimmbewegungen der Ratte, entstanden im Tonabnehmer Impulse. Diese flossen zum Verstärker C, wurden in der Doppelröhre ECL 113 verstärkt, gelangten über den Ausgangstransformator zu einem Wechselstromrelais, dessen Kontakt dadurch geschlossen wurde. In diesem Relais-Stromkreis lag ein 5-sec-Ausschalter, der periodisch durch sein Öffnen ein dahintergeschaltetes Zählrelais um eine Stelle weiterschob. Es wurden also die 5-sec-Intervalle gezählt, in denen Stromimpulse ankamen, und damit die Schwimmzeit der Ratte bestimmt. Wenn das Tier nicht mehr schwamm, kamen auch keine Impulse mehr an.

Für jeden Behälter war solch eine Einrichtung vorgesehen. Sie hatte den Nachteil, daß sich durch Verdunstung des Wassers das Niveau senkte und dadurch wiederum der Zug an dem Tonarm änderte.

Durch die hieraus entstehende Dämpfung des Impulsgebers war es unter Umständen möglich, Geräusche des Hauses fälschlicherweise mitzuregistrieren. Durch Anbringung eines Niveau-Ausgleiches ließ sich diese Fehlerquelle relativ einfach beseitigen.

Später wurde noch ein zweiter Zählkanal in den Verstärkerausgang gelegt, der im Halbminutenintervall Zählstellen schob. So wurde es dann durch Vergleich beider Kanäle möglich, zu errechnen, wie viele halbe Minuten die Ratten ohne Schwimmbewegungen blieben.

Weil die Ratten es jedoch teilweise lernten, den Schwimmkörper zum Ausruhen zu benutzen, wodurch die wahre Schwimmzeit verschleiert wurde, war es erforderlich, das Wasser an der Oberfläche sanft zu bewegen. Und damit mußte nun auch von der Verwendung der Schwimmkörper abgegangen werden.

Als neue Möglichkeit bot sich die photographische Registrierung an.

Dazu wurde eine Robotkamera mit elektrischer Auslösung und extralangen Spezialaufzug verwendet. Die Schwimmbehälter wurden mit Tageslichtleuchten angestrahlt. Eine elektrische Uhr mit Sekundenzeiger und eine Tafel mit Versuchsnummer und anderen Daten wurden in das Blickfeld der Kamera gestellt.

Die Bestimmung des Schwimgewichtes habe ich zusammen mit Herrn Prof. Zahn nach einer von ihm entwickelten und erprobten Methode durchgeführt.

Danach wurde das schwimmende Tier am Schwanz unter Wasser gezogen und mit einem Schlag betäubt. Dabei mußte fast gleichzeitig mit einer Gefäßklemme die Luftröhre abgeklemmt werden.

Der Erstickungstod trat dann sehr rasch ein.

Mit einer weiteren Klemme mußte dann ebenfalls der Anus verschlossen werden, um das Entweichen jeglicher Gase zu verhindern.

In untergetauchtem Zustande wurde das Tier unter Abzug der Klemmen gewogen. Die erhaltene Größe bezeichneten wir als Schwimmgewicht.

Die Auswertung der Zahlen erfolgte nach dem t-Test (Student) und nach dem x-Test (S. van der Waerden, 87).

C) Ergebnisse

- a) Die ersten Versuche ergaben schon den Befund der großen Streuung der Zahlenwerte. Dieser Punkt, sowie die voraussichtlich notwendig werdende Zahl von Versuchen, bei einer gewünschten Irrtumswahrscheinlichkeit wurde errechnet nach Wald (88). Wegen der Grausamkeit der Versuche wurden die Zahlen möglichst niedrig gehalten.
- b) Bei den Bestimmungen der Schwimmdauer mittels Impulsregistrierung fiel auf, daß die Tiere u.U. längere Zeiten nicht schwammen und dann wieder begannen. Solche Tiere erreichten u.U. extreme Schwimmzeiten.
- c) Bei der Kameraregistrierung und bewegtem Wasser wurde dies nicht beachtet. Abb. 11 gibt einen Teil eines Registrierstreifens wieder. Man sieht an den verzerrten Reflexen der Tageslichtlampe an der Wasseroberfläche, daß beide Tiere immer in Bewegung waren.
- d) Eine kleine Versuchsreihe wurde bei einer Wassertemperatur von 28°C durchgeführt. Die Versuchstier-Reihe erhielt Cyt. c + Strophantin. Dabei wurde fühlbare Wasserbewegung vermieden. Die mittlere Schwimmdauer der Tiere betrug 9400 sec. entsprechend etwa $2\frac{1}{2}$ Std. Der Mittelwert war bei den Kontrollen mit Standardabweichung $\overline{XK}_1 = 822 = 7000$ sec. und bei Cyt. c-Tieren $\overline{XV}_1 = 10500 = 7500$ sec. Zwischen beiden Reihen ist mit statistischen Methoden kein Unterschied zu sichern. Bei Beibehaltung der Versuchsanordnung und der Tierstämme müßten etwa 500 - 1000 Versuche gemacht werden (Sequential analysis nach Wald), um die Frage:

Erzeugt Cyt. c-Strophantin-Injektion einen Unterschied der Schwimmdauer zu unbehandelten Tieren; mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 2,7 % beantworten zu können.

Tabelle 2

Schwimmzeiten von Ratten, die 4,5 mg Cyt. c und 0,0375 mg Strophantin erhalten haben. Die Wassertemperatur betrug dabei 28°C.

Laufende Nummer	Schwimmzeiten in sec. 10^2	
	Kontrolle	Versuchstier
1	82	85
2	40	197
3	15	11
4	125	197
5	149	36

- e) Bei einem Versuch der Bestimmung der Schwimmdauer bei einer Wassertemperatur von 35°C ohne Wasserbewegung wurden 2 x 15 Tiere verwendet.

Die mittlere Schwimmdauer aller Tiere dieser Reihe betrug 71100 sec., war also acht mal so lange wie bei der Temperatur von 28°C.

Der Mittelwert bei den Kontrollen war:

$$\bar{X}_{K_2} = 60700 \pm 18300 \text{ sec.}$$

Es hat den Anschein, als bestünde ein Unterschied zwischen den Schwimmzeiten beider Reihen, wonach die Cyt. c-Tiere etwa 1/3 länger aushielten. Die sorgfältige Anwendung des T-Testes (Student) bzw. des X-Testes (van der Waerden, Nievergelt) ergibt - in einfacher Ausdrucksweise - folgendes: Es besteht eine mögliche Verlängerung der Schwimmdauer bei den Cyt. c-Tieren.

Für die Annahme dieser Behauptung beträgt die Irrtumswahrscheinlichkeit 5 % ($t_{\text{exper}} = 2,045$; $p = 0,05$). Für die Behauptung einer biologischen Wirkung reicht die Information bei kritischer Betrachtung nicht aus. Soll in diesem Sinne die Annahme gesichert werden, ($p = 0,001$) so müssen ca. 300 Versuche gemacht werden. (Sequential analysis nach Wald)

Tabelle 3

Schwimmzeiten von Ratten, die 4,5 mg Cyt. c und 0,0375 mg Strophantin erhalten haben. Die Wassertemperatur betrug dabei 35°C. Das Wasser wurde nicht merklich bewegt.

Laufende Nummer	Schwimmzeit in sec. 10 ²		Differenz
	Kontrolle	Versuchstier	
1	621	1039	468
2	930	1038	108
3	273	599	326
4	234	792	558
5	639	804	275
6	594	972	378
7	468	858	490
8	648	648	000
9	78	726	648
10	576	1050	484
11	576	612	36
12	1126	726	- 400
13	282	804	522
14	1440	504	- 944
15	621	1005	384

2. Versuch bei 35°C mit stärkerer Wasserbewegung.

f) Dabei wurden 2 x 10 Versuchstiere verwendet.
 Die mittlere Schwimmdauer dieser Tiere betrug
 48700 $\pm$ 25990 sec. das sind etwa 13 Std.
 Der Mittelwert der Kontrolltiere betrug:

$\bar{X}K_2$ 56700 $\pm$ 29800 sec.

und bei den Cyt. c-Tieren:

$\bar{X}V_2$ 40700 $\pm$ 22000 sec.

Bei der Betrachtung dieser Zahlen möchte man meinen,
 daß sich 1. die Schwimmzeiten aller vermindert haben,
 (was sich statistisch allerdings nicht sichern läßt).
 2. die Cyt. c-Tiere jetzt kürzer als die Kontrollen
 schwimmen, (was statistisch auch nicht zu sichern
 ist.)

Zur Sicherung dieser beiden Aussagen müßten ca.

300 Versuche gemacht werden. (Wald, Sequential analysis)

Tabelle 4

Schwimmzeiten von Ratten, die 4,5 mg Cyt. c und
 0,0375 mg Strophantin erhalten haben. Die Wasser-
 temperatur betrug dabei 35°C. Das Wasser wurde stark
 bewegt.

Laufende Nummer	Schwimmzeiten in sec. 10 ²		Differenz
	Kontrolle	Versuchstier	
1	780	726	- 54
2	828	630	- 198
3	540	234	- 306
4	576	576	000
5	666	180	- 486
6	126	612	486
7	846	486	- 360
8	918	252	- 666
9	171	234	63
10	216	144	- 72

g) Vergleich der Versuche bei 35°C mit und ohne Wasserbewegung.

a) Kontrollen

Die mittlere Schwimmdauer aller Kontrollen ohne Wasserbewegung wird mit denen mit Wasserbewegung verglichen.

$$\bar{X}K_1 = 60700 \pm 35200 : \bar{X}K_2 = 56700 \pm 29800 \text{ sec.}$$

Ein Unterschied läßt sich keinesfalls sichern, das heißt, die mittlere Schwimmzeit der Kontrollen ist mit und ohne Wasserbewegung die gleiche.

b) Cyt. c-Tiere

Die mittlere Schwimmdauer aller Cyt. c-Tiere ohne Wasserbewegung wird mit denen mit Wasserbewegung verglichen.

$$\bar{X}V_1 = 81500 \pm 18300 : \bar{X}V_2 = 40700 \text{ sec.}$$

Hier ist mit den Mitteln der statistischen Analyse ein hochsignifikanter Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit weit unter 0,1 % zu sichern.

$$\text{T-Test: } t_{\text{exper.}} = 5,00; t_{\text{Tab.}} = 3,77; p = 0,001.$$

Die mittlere Schwimmzeit der mit Cyt. c-Strophantin gespritzten Tiere ist bei 35°C in ruhigem Wasser länger als in bewegtem.

h) Differenzialanalyse.

Jeder Versuch ist vom andern zwangsläufig verschieden durch eine Summe zu bewertender Ursachen. (Alter der Tiere, physiologischer Ernährungszustand, Störungen durch Lärm usw.). Diese Faktoren führen u.U. zu starken Streuungen der gemessenen Werte. Deswegen sind vor allem die Tiere aus einem Versuch, also der jeweiligen Kontrolle miteinander vergleichbar. Soll die statistische Sicherung des Versuchsergebnisses auf diese Überlegung abgestellt werden, so ist ein Verfahren zu wählen, welches möglichst die Streuungsgröße enthält und auch die beiden Ergebnisse eines Versuches miteinander vergleicht.

Daher wurde die Differenz (letzte Spalte in den Tabellen) aus der Schwimmzeit der Versuchstiere und der der Kontrolltiere errechnet. Zur Bewertung solcher Reihen gibt es besondere statistische Analyse-Verfahren. Hier wurde der modifizierte X-Test von van der Vaerden und Nievergelt verwendet, weil seine Aussage sehr scharf ist.

a) Bei 28°C ist zwischen den Kontrollen und den Cyt. c-Tieren kein Unterschied zu sichern.

b) Bei 35°C schwimmen im ruhigen Wasser die Cyt. c-Tiere länger als die Kontrollen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p kleiner als 0,5 %.

c) Im bewegten Wasser ist bei 35°C kein Unterschied der Schwimmzeiten beider Tiergruppen zu sichern.

- i) Nachdem so die Interpretation der Befunde von Hutschenreuter und Pitzler durch diese Autoren von uns abgelehnt werden muß, erhebt sich die Frage, ob der von ihnen gewählte Versuchsansatz überhaupt günstig ist.

Außer der Möglichkeit eines Effekts des Cyt. c auf die Schwimmdauer der Ratte sind die ganzen Versuche mit einem Zweifel belastet.

Daher wurden von uns Ratten zunächst ermüdet, dann gespritzt und schließlich bis zur Erschöpfung zum Schwimmen gebracht.

Dabei würde sich eventuell ein Erholeffekt auf den schon ermüdeten Organismus zeigen. Es erschien denkbar, daß dabei ein großer Unterschied besteht zur Verabreichung zu Beginn des Versuches.

Zunächst wurde kombiniert gespritzt.

Tabelle 5

Die Wirkung von 4,5 mg Cyt. c und 0,0375 mg Stro-
phantin auf die Schwimmdauer bereits ermüdeter Ratten.
Die Injektion erfolgte nach der in Spalte 2 angege-
benen Zeit. Wasserbewegung im ersten Abschnitt des
Versuchs.

Lfd.Nr.	Schwimm- dauer in sec. x 10 ²	Zusätzliche Schwimmdauer in sec. x 10 ²		Differenz
		NaCl	mit Cyt. c u. Strophantin	
1	500	825	1130	2780
2	500	0	156	156
3	500	153	222	69
4	480	114	5518	404
5	500	310	187	- 123
6	500	299	179	- 120
7	470	166	182	16
8	500	364	292	- 72
9	500	202	189	- 13
10	500	140	171	31
11	500	140	372	132
12	500	69	258	189
13	520	242	217	- 25
14	520	273	125	- 148
15	520	103	174	71
16	520	354	18	- 336
17	500	298	212	- 86
18	500	129	284	155
19	500	87	186	99
20	500	267	129	- 138
21	500	307	287	- 20
22	500	27	193	166
23	500	186	296	110
24	500	227	279	52

$\bar{x} = 221,21 \quad \Sigma = 5309$

$\bar{x} = 216,42 \quad \Sigma = 5149$

Bei einer Differenz von weniger als 5 ist keine
Signifikanz zu erwarten.

k) Es erscheint zunächst überraschend, daß hier keine Differenz gefunden wird. Diese Differenz kann aus zwei Gründen null sein: einmal weil Cyt. c + Strophanthin keinen Effekt auf die Schwimmzeiten haben, zum anderen kann ein verlängernder Effekt des einen Pharmakons durch einen verkürzenden des anderen aufgehoben werden. Um diese Möglichkeit zu untersuchen wurden ermüdete Tiere mit Strophanthin alleine injiziert.

Tabelle 6

Über die Wirkung von 0,0375 mg Strophanthin allein auf das im Schwimmversuch bereits ermüdete Tier (Wasserbewegung vor und nach der Injektion).

Lfd.Nr.	Schwimm- dauer in sec.x10 ²	Zusätzliche Schwimmdauer in sec. x 10 ²		Differenz
		NaCl	mit Strophanthin	
1	504	51	195	144
2	504	363	287	- 76
3	504	217	302	104
4	504	295	188	- 107
5	504	100	195	95
6	504	156	215	59
7	504	194	122	- 38
8	504	334	184	- 150
9	504	251	126	- 37
10	504	342	180	- 162
11	504	305	83	- 222
12	504	232	240	8
13	504	236	120	- 18
14	504	233	371	38
15	504	271	191	80
16	504	301	193	- 108
17	504	367	294	- 73
18	504	126	147	21
19	504	133	79	54
20	504	179	161	18
21	504	34	21	13
22	504	93	157	64

$$\bar{x}_{\text{ohne}} = 218,14 \pm 9,87 \quad \bar{x}_{\text{mit}} = 191,86 \pm 8,01$$

Tab.: 7

Berechnung der Streuung

$$s^2 = \frac{1}{N-1} \left(\sum_{i=1}^N x_i^2 - \bar{x} \sum_{i=1}^N x_i \right); \quad \bar{x} = \frac{1}{N} \left(\sum_{i=1}^N x_i \right)$$

Anzahl der Werte	$\sqrt{}$	22	22
Summe der Werte	$\sum_{i=1}^N x_i$	4799	4221
Mittelwert	$\bar{x}$	218,14	111,86
Quadratsumme der Werte	$\sum_{i=1}^N x_i^2$	1252541	944687
	$\bar{x} \sum_{i=1}^N x_i$	1046854	809841
	$s^2 (N-1)$	2056,87	1348,46
	s^2	97,95	64,21
	$s \pm$	9,87	8,01

Als Beispiel wurde hier noch das Rechenverfahren für die Streuungsberechnung angefügt, auch aus dem Grunde, weil aus nicht zu ermittelnden und leider nicht zu wiederholenden Gründen in diese Versuchsreihe die Streuungen so extrem gering waren.

Die Betrachtung von Mittelwert und Streuung legt den Verdacht nahe, daß Strophantin-Injektion die Schwimmdauer von Ratten verkürzt.

- 1) Dieses Resultat, sollte es gesichert werden können, legt den Schluß nahe, daß Cyt. c die Schwimmdauer verlängert.

1) Tabelle 8

Über die Wirkung von 4,5 mg Cyt. c allein auf das im Schwimmversuch bereits ermüdete Tier (Wasserbewegung vor und nach der Injektion.)

Lfd.Nr.	Schwimm- dauer in sec.x10 ²	zusätzliche Schwimmdauer		Differenz
		NaCl.	mit Cyt. c.	
1	504	235	471	236
2	504	195	310	115
3	504	28	61	33
4	504	93	220	127
5	504	109	74	- 35
6	504	48	201	153
7	504	271	162	- 109
8	504	5	70	65
9	504	30	48	18
10	504	59	159	100
11	504	106	58	- 48
12	504	136	120	- 16
13	504	99	191	92
14	504	102	71	- 31
15	504	55	300	245
16	504	42	56	14
17	504	7	94	87
18	504	52	150	98
19	504	48	131	83
20	504	33	241	208
21	504	111	88	- 23
22	504	107	79	- 28
23	504	77	107	30
24	504	226	188	- 48
25	504	290	139	- 151
26	504	16	129	103

$$\bar{X}K = 95,4 \pm 85,5 \quad \bar{X}V = 150,7 \pm 98,0$$

Tabelle 9

Berechnung der Streuung

$$s^2 = \frac{1}{N-1} \left(\sum_{i=1}^N x_i^2 - \bar{x} \sum_{i=1}^N x_i \right), \quad \bar{x} = \frac{1}{N} \left(\sum_{i=1}^N x_i \right)$$

Anzahl der Werte	N	ohne	mit
		26	26
Summe der Werte	$\sum_{i=1}^N x_i$	2480	3918
Mittelwert	$\bar{x}$	95,384	150,692
Quadratsumme der Werte	$\sum_{i=1}^N x_i^2$	420718	830408
	$\bar{x} \sum_{i=1}^N x_i$	236552	590411
	$s^2(N-1)$	184116	239997
	s^2	7367	9600
	$s \pm$	85,8	98,0

- m) Die nachfolgende Tabelle gibt - als Rechenbeispiel
aufgeführt - die Ausführung des t-Testes (Student)
mit den Werten, die in den Tabellen ermittelt wurden.

Tabelle 10

	Strophantin	Cyt. c.	
$S_1^2 (N_1-1)$	2056,87	184166	
$S_2^2 (N_2-1)$	1348,46	239997	
$S_d^2 (N_2+N_1-2)$	3405,33	424163	
S_d^2	85,133	8483,26	
S_d	9,23	92,1	
$\bar{X}_2$	218,14	95,38	
$\bar{X}_1$	191,86	160,69	
$\bar{X}_2 - \bar{X}_1 = D$	26,28	55,31	
$\frac{N_1 \cdot N_2}{N_1 + N_2} = Q$	$\frac{484}{44} = 11$	$\frac{676}{52} = 13$	
$\sqrt{Q}$	3,32	3,16	
$\frac{\sqrt{Q} \cdot D}{S_d} = t_{\text{exp.}}$	9,46	2,17	
$t_{\text{tab.}}$	2,7	2,17	
p	0,005	0,025	

Das Ergebnis der Tabelle ist folgendes:

Die Frage, ob die Unterschiede (zweiseitiger Test) in den Schwimmdauern der mit Strophantin injizierten Tiere zu ihren Kontrollen zufällig bedingt sein kann, wird verneint bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit weit unter 0,5 %. Auch die Frage ob dieser Unterschied, wenn er als Verkürzung der Schwimmzeit gedeutet (einseitiger Test) wird, zufällig bedingt sein kann, ist zu verneinen. Es ist jedoch bei der gewichtsmäßigen Wertung dieser Aussage die ungeklärt niedrige Streuung mit zu bedenken.

Die andere Frage, ob die nach Injektion von Cyt. c gefundenen Unterschiede überzufällig sind, läßt sich jedoch nur bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 2,5 % bejahen (zweiseitiger Test). Da hier jedoch eine Voraussage über das Vorzeichen des Unterschiedes der Schwimmdauer besteht - nämlich Verlängerung gegenüber den Kontrollen - läßt sich die gleiche Schranke für den einseitigen Test halten. Damit ist auch dieses Resultat, besonders bei der hohen Streuung, als signifikant zu bezeichnen.

- n) Nachdem hier also das Ergebnis vorliegt, daß das Cytochrom c-Präparat die Schwimmdauer signifikant verlängert, wäre es günstig, noch einen Hinweis auf den Mechanismus, der dies bewirken mag, zu geben.

Aus weniger kritischer Einstellung heraus ließe sich hier eine Theorie der biologischen Wirkung von Cyt. c aus dem in der Einleitung Entwickelten entwerfen.

Die soll unterbleiben.

Die Beobachtung des Schwimmverhaltens der Tiere, besonders mancher extremer Fälle zeigte, daß diese besonders in späten Stadien 10 Minuten lang ohne eine Bewegung im Wasser flottierten, wobei lediglich die äußerste Nasenspitze über der Oberfläche war, und sie ganz schnell und flach atmeten. Dies legt den Verdacht nahe, daß solche Tiere ein geringeres Schwimmgewicht haben als andere.

Daraufhin haben wir das Schwimmgewicht bei 40 Tieren bestimmt.

Tabelle 11

Über die negativen Schwimmgewichte (Auftrieb) von Ratten mit und ohne Injektion von Cyt. c.

Lfd.Nr.	Schwimm- dauer in sec.x 10 ²	Negatives Schwimmgewicht der Ratten in g		Differenz
		nach Na Cl Inj.	nach Cyt.c- Inj.	
1	504	0,48	0,52	0,04
2	504	- 0,27	0,28	0,55
3	525	- 0,31	0,93	1,24
4	518	- 0,02	- 0,45	0,43
5	504	- 1,20	- 1,06	0,14
6	630	- 0,76	0,98	1,22
7	504	- 0,03	0,25	0,28
8	504	0,80	0,07	0,73
9	504	- 0,05	- 0,31	0,26
10	504	- 0,05	0,05	0,10
11	509	0,33	0,72	0,39
12	504	0,26	0,14	0,12
13	509	- 0,11	0,13	0,24
14	611	- 0,40	- 0,46	0,06
15	620	- 0,82	0,03	0,99
16	620	- 0,56	- 0,02	0,54
17	504	- 0,42	- 0,28	0,14
18	504	0,93	- 0,17	1,10
19	504	- 0,16	1,12	1,28
20	504	- 0,16	1,12	1,28
		- 3,84	3,02	

$$\bar{X} = -0,192;$$

$$\bar{X} = 0,155;$$

n) Aufgrund der Ergebnisse von Tab. 10 bestand die spekulative Voraussage, daß falls die Verlängerung der Schwimmdauer bei den mit Cyt. c gespritzten Ratten auf einer Änderung des Schwimmgewichtes beruhe, die Cyt. c-Ratten leichter sein müßten.

Die letzte Spalte von Tabelle 11 gibt die Differenz zwischen dem negativen Schwimmgewicht (Auftrieb) der mit Cyt. c behandelten Tiere und den dazugehörigen Kontrollen. Diese Differenzen sind alle positiv, d.h. in jedem Falle ist der Auftrieb der Cyt. c-Tiere größer als der der dazugehörigen Kontrollen. Es waren in diesem Versuch nur solche Tiere genommen worden, die mindestens 1 Woche zusammen im Käfig gesessen hatten, deren Darminhalt etc. also möglichst gleich war.

D) D i s k u s s i o n

Soll die von manchen Klinikern in Einzelfällen behauptete Wirkung von Cytochrom c objektiviert werden, so ist es erforderlich, einen biologischen Test zu entwickeln. Bis auf einen, bisher noch nicht weiter entwickelten Ansatz, scheint noch keine Möglichkeit dafür zu existieren.

Die Publikation von Hutschenreuter und Pitzler (89) bietet hier eine weitere Ansatzmöglichkeit.

Ernstere Einwände gab es jedoch gegen eine Versuchsmethode, bei der Ratten bis zum Ertrinken schwimmen mußten. Der Haupteinwand war die Grausamkeit der Versuche. Falls sich jedoch die Behauptung der Autoren als richtig herausstellen sollte, ließe sich sicher ein Weg finden, der zwar kostspielig aber dafür weniger grausam wäre.

Die genaue Reproduktion der Versuche von Hutschenreuter und Pitzler gelang nicht. Mit unseren Tieren und den möglichst genau eingehaltenen Bedingungen war es nicht möglich, eine Häufigkeitsverteilung zu erhalten, die der der Autoren entsprach. Wurde dagegen jede Wasserbewegung durch die Umwälzpumpe möglichst vermieden, so ergaben sich bei einzelnen Tieren Rekordschwimmzeiten. Dieser Befund befindet sich also, abgesehen von den genauen Umständen, unter denen er erhoben werden konnte, in Übereinstimmung mit dem der anderen Autoren.

Erheblich anders dagegen sieht das Bild aus, wenn das Wasser, in dem die Tiere schwimmen, etwas bewegt wird. Zwar verkürzt sich dabei die mittlere Schwimmzeit der Kontrollen möglicherweise um einen gewissen Betrag. Jedoch ergibt sich bei den mit Cyt. c gespritzten Tieren ein erheblicher Leistungsabfall. Bei kritischer statistischer Bewertung gelangt man zu dem Ergebnis, daß im Rahmen für uns tragbarer Versuchszahlen - ein Versuch dauert mindestens 2 Tage - eine Klärung der Frage nicht möglich ist.

Es erscheint günstig, außer der Wasserbewegung noch einen weiteren Faktor, nämlich den Zeitpunkt der Injektion in Bezug auf den Versuchsbeginn zu variieren. Weitaus die meisten Tiere überlebten 14 Std. Schwimmdauer. Erst danach gespritzt, hat man eine Möglichkeit, mit den Vorermüdeten, beinahe erschöpften Tieren zu arbeiten.

Es läßt sich kein Unterschied zwischen den mit Mischpräparat injizierten und den Kontrolltieren feststellen. Bei der Trennung der einzelnen Komponenten des Präparates ergibt das Strophantin allein eine Verkürzung, das Cyt. c dagegen eine Verlängerung der Schwimmdauer.

Bei der Bewertung der Strophantinversuche ist zu bedenken, daß die Streuung im Vergleich zu allen anderen Versuchen zu gering ist. Für die logischen Schlüsse bezüglich der Cyt. c-Komponente hängt jedoch nicht viel von der eventuellen Falschbewertung der Versuche ab.

Das Entscheidende Ergebnis scheint mir eine Verlängerung der Schwimmdauer zu sein, die sich als Folge bei Cyt. c-Injektion einstellt. Diese Verlängerung der Schwimmdauer erschöpfter Tiere könnte man in Übereinstimmung mit den in der Einleitung geschilderten Theorie über die Funktion des Cyt. c in der Zelle sehen.

Die aufgeführten Befunde zwingen aber zu der Suche nach anderen Deutungsmöglichkeiten. Die Tatsache, daß geringere Wasserbewegung einen so großen Unterschied verursacht, ist offenbar nicht darauf zurückzuführen, daß der Leistungsabfall dynamisch bedingt sein könnte. Vielmehr sieht es so aus, als sei dadurch eine Schon-Möglichkeit weggefallen, die die Kontrollen weniger betrifft als die Cyt. c-Tiere. Bei der Akzeptierung dieser Gedankengänge bieten sich zwei Erklärungen an:

- 1) Der Einfluß eines psychischen Faktors
- 2) Der Einfluß eines physischen Faktors

zu 1)

Nach Meinung mancher Autoren übt Cyt. c einen starken Einfluß auf die psychische Leistungsfähigkeit aus. Danach könnten es die Cyt. c-Tiere schnell gelernt haben, ihr Verhalten auf eine Kräfteersparnis einzustellen; zum Beispiel, wie es verschiedentlich zu beobachten war, durch Anlehnen ihrer Barthaare oder des Kopfes an den Schwimmer der Registriereinrichtung. Durch die Wasserbewegung dagegen wurde die Abstützung an dem relativ glatten Schwimmer vereitelt. In diesem Falle also wäre mit ziemlicher Wahrscheinlichkeit der Cyt. c-Effekt ein psychischer gewesen, wenn er zur Testung des Präparates verwendet werden sollte.

zu 2)

Sollte ein physischer Faktor eine Rolle spielen, so könnte dies praktisch nur die Änderung des spezifischen Gewichtes sein. Zu denken wäre an eine Blähung der Lungen oder an eine Gasbildung im Darm. Dadurch hätten die Cyt. c-Tiere einen erhöhten Auftrieb, der ihnen im unbewegten Wasser ein längeres Aushalten ermöglicht, wogegen beim bewegten Wasser eine verminderte Leistungsfähigkeit zum Ausdruck kommt.

Durch die gemeinsam mit Prof. Zahn durchgeführten Versuche zur Bestimmung des Schwimmgewichtes ermüdeter Ratten nach Cyt. c-Injektion ergab sich ein klarer Unterschied. Wahrscheinlich sind die Tiere gebläht. Möglicherweise geht ein Anstieg der Residualluft auf eine Änderung in der Atemmuskulatur zurück. Darüber kann an dieser Stelle nichts weiteres ausgesagt werden.

E) Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurde der Versuch unternommen, mit Hilfe einer Publikation von Hutscheureuter und Pitzler einen biologischen Test für das Cytochrom c zu finden. Dazu wurden Verfahren zur automatischen Registrierung der Schwimmdauer von Ratten entwickelt. Die Apparaturen und Einrichtungen hierzu werden beschrieben.

Jedes Versuchstier wurde mit einem Kontrolltier verglichen.

In den ersten Versuchsreihen wurden 4,5 mg Cyt. c zusammen mit 0,0375 mg Strophantin in 2,5 ml physiologischer Kochsalzlösung in die Schwanzvenen gespritzt. Die Kontrolltiere erhielten nur 2,5 ml physiologischer Kochsalzlösung.

Bei einer Wassertemperatur von 28°C schwimmen die Tiere etwa gleich lang, während bei 35°C die Cyt. c-Tiere länger schwimmen.

Wird dagegen das Wasser bewegt, übertreffen die Kontrolltiere die anderen. Insgesamt ist die Schwimmdauer im wärmeren Wasser länger als im kälteren. Für die Umkehr der Schwimmdauern ohne und mit Wasserbewegung bei 35°C wird das Ausruhen der Cyt. c-Tiere im unbewegten Wasser angesehen, während im bewegten Wasser ihre geringere Ausdauer in Erscheinung tritt.

Läßt man alle Tiere erst 14 Std. schwimmen und gibt ihnen dann die Injektionen, um sie anschließend weiter schwimmen zu lassen, so ist zwischen Kontroll- und Versuchstieren kein Unterschied festzustellen.

Wird nur der Strophantin-Anteil gespritzt, so bewirkt er eine Verkürzung, der Cyt. c-Anteil dagegen eine Verlängerung der Schwimmdauer der ermüdeten Tiere. Bei den Cyt. c-Tieren wird ein größerer Auftrieb als bei den Kontrollen nachgewiesen.

Es wird als möglicher Grund für die Verlängerung der Schwimmzeit angesehen.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. H.K. Müller für die leihweise Überlassung von Verstärker- und Impulszählerteilen danken.

Herrn Dr. Mücke aus Illertissen danke ich für seine Ratschläge, wertvolle Literaturhinweise und die freundliche Überlassung von Versuchsmengen des Präparates Cyto-Mack. Ganz besonders dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. Rudolf K. Zahn für die Überlassung des Themas und seinen liebenswürdigen Beistand bei der Konzeption der Versuche und der Verfahrenstechnik.

Literatur

1. M. Traube	Ber. dtsh. chem. Ges.	<u>15</u> (1882) 659 <u>15</u> (1882) 2421
2. M. Traube	Ber. dtsh. chem. Ges.	<u>18</u> (1885) 1877
3. M. Traube	Gesamm. Abhandlungen, Berlin	(1899)
4. H. Wieland	Erg. Physiol.	<u>20</u> (1922) 477
5. H. Wieland	Handb. d. Biochemie Bd. 2, Jena	Ste. 252 (1923)
6. H. Wieland, V. Bergel	Liebigs Ann. Chem.	<u>439</u> (1924) 196
7. O. Warburg	Erg. Enzymforsch.	<u>7</u> (1938) 219
8. O. Warburg	Biochem. Z.	<u>189</u> (1927) 354
9. O. Warburg	Biochem. Z.	<u>187</u> (1927) 255
10. O. Warburg	Biochem. Z.	<u>177</u> (1926) 417
11. O. Warburg	Biochem. Z.	<u>242</u> (1931) 159
12. O. Warburg, T. Sahuma	Biochem. Z.	<u>142</u> (1923) 168
13. O. Warburg, W. Brefeld	Biochem. Z.	<u>145</u> (1924) 416
14. O. Warburg, U. Negelein	Biochem. Z.	<u>113</u> (1921) 416
15. O. Warburg, U. Negelein	Biochem. Z.	<u>142</u> (1923) 493
16. O. Warburg, U. Negelein	Biochem. Z.	<u>233</u> (1931) 486
17. O. Warburg, U. Negelein	Biochem. Z.	<u>128</u> (1931) 135
18. O. Warburg, U. Negelein	Biochem. Z.	<u>262</u> (1933) 237
19. O. Warburg, U. Negelein	Biochem. Z.	<u>266</u> (1933) 1
20. O. Warburg, B. Saenger	Schwermet. als Wir- kungsgruppe von Fermenten	(1946)
21. O. Warburg, B. Saenger	Zentralbl. f. Chemie	<u>92</u> (1914) 231
22. O. Warburg, B. Saenger	Die Naturw.	<u>15</u> (1927) 546
23. O. Warburg, B. Saenger	Über die katalytische Wirkung der lebenden Substanz, Berlin	(1928)
24. M. Dixon, K.A.C. Elliot	Biochem. J.	<u>23</u> (1929) 812
25. F. Batelli, L. Stern	Biochem. Z.	<u>21</u> (1909) 487
26. F. Batelli, L. Stern	Erg. Physiol.	<u>12</u> (1912) 96
27. F. Kubowitz,	Biochem. Z.	<u>157</u> (1937) 221
28. W. Dirscherl, F. Hanusch	Hoppe-Seyler	<u>236</u> (1935) 131
29. L.J. Gillespie, T.H. Liu	J. Amer. Chem. Soc.	<u>53</u> (1931) 3969
30. S. Spoeher	J. Amer. Chem. Soc.	<u>46</u> (1924) 1494

31. H. Theorell	Biochem. Z.	<u>252</u> (1932) 1
32. H. Theorell	Biochem. Z.	<u>286</u> (1934) 46 <u>286</u> (1934) 55 <u>286</u> (1934) 64 <u>286</u> (1934) 73
33. H. Theorell	Biochem. Z.	<u>279</u> (1935) 463
34. H. Theorell	Biochem. Z.	<u>285</u> (1936) 207
35. H. Theorell	Biochem. Z.	<u>301</u> (1939) 203
36. H. Theorell	Biochem. Z.	<u>298</u> (1938) 242
37. H. Theorell, S. Akesson	J. Amer. Chem. Soc.	<u>63</u> (1941) 1804
38. H. Theorell, S. Akesson	J. Amer. Chem. Soc.	<u>2</u> (1943) 231
39. D.L. Harrison	Biochem. Z.	<u>18</u> (1924) 1009
40. H.A. Krebs	Biochem. Z.	<u>180</u> (1926) 377
41. H.A. Krebs	Biochem. Z.	<u>204</u> (1929) 343
42. H.A. Krebs	Biochem. Z.	<u>220</u> (1930) 281
43. H.A. Krebs	Biochem. Z.	<u>238</u> (1931) 174
44. M. Griffiths	J. Biol. Chem.	<u>197</u> (1952) 399
45. L.B. Mendel, A.F. Blood	J. Biol. Chem.	<u>8</u> (1910) 177
46. O.M. Reiff	J. Amer. Chem. Soc.	<u>48</u> (1926) 2893
47. S. Toda	Biochem. Z.	<u>172</u> (1926) 17
48. T. Mc. Munn	Zbl. f. Physiol. Chem.	<u>14</u> (1890) 106
49. H. Fischer	Zbl. f. Physiol. Chem.	<u>135</u> 253
50. H. Fischer	Zbl. f. Physiol. Chem.	<u>138</u> 288
51. H. Fischer	Zbl. f. Physiol. Chem.	<u>140</u> 57
52. H. Fischer	Zbl. f. Physiol. Chem.	<u>144</u> 101
53. H. Fischer	Mü. Med. Wochenschr.	<u>377</u> (1916)
54. H. Fischer	Mü. Med. Wochenschr.	<u>1143</u> (1923)
55. A. Vanotti	Porphyryne u. P.-Krankh. Springer, Berlin	(1937)
56. M.L. Anson, A.C. Mirsky	Z. Physiol.	<u>60</u> (1925) 50
57. M.L. Anson, A.C. Mirsky	Z. Physiol.	<u>60</u> (1925) 161
58. M.L. Anson, A.C. Mirsky	Z. Physiol.	<u>60</u> (1925) 221
59. H.E. Davenport	Nature	<u>169</u> (1952) 75
60. I.E. Falk	Biochem. Z.	<u>51</u> (1952) 36
61. E.G. Ball	Biochem. Z.	<u>259</u> (1938) 262
62. E. Hoos	Die Naturw.	<u>22</u> (1934) 207
63. C.A. Appelby, K.K. Morton	Biochem. Z.	<u>75</u> (1960) 258
64. R. Ammon, W. Dirscherl	Fermente, Hormone, Vitamine	Lehrbuch

65. D. Keillin	Proc. Roy. Soc.	<u>B 98</u> (1925) 312
66. D. Keillin	Proc. Roy. Soc.	<u>100</u> (1926) 129
67. D. Keillin	Proc. Roy. Soc.	<u>104</u> (1929) 206
68. D. Keillin	Proc. Roy. Soc.	<u>106</u> (1930) 418
69. D. Keillin, E.F. Hartree	Proc. Roy. Soc.	<u>122</u> (1937) 298
70. D. Keillin, E.F. Hartree	Proc. Roy. Soc.	<u>B 129</u> (1940) 177
71. D. Keillin, E.F. Hartree	Biochem. Z.	<u>41</u> (1947) 500
72. K. Zeile, F. Reuter	Hoppe-Seyler	<u>221</u> (1933) 101
73. K. Zeile, F. Reuter	Hoppe-Seyler	<u>236</u> (1935) 212
74. K. Zeile, H. Meyer	Hoppe-Seyler	<u>27</u> (1939) 596
75. K. Zeile, H. Meyer	Hoppe-Seyler	<u>262</u> (1939) 178
76. K. Zeile, H. Meyer	Hoppe-Seyler	<u>265</u> (1940) 22
77. A. Fujita	Biochem. Z.	<u>301</u> (1939) 1376
78. E. Stotz	Zbl. f. biol. Chem.	<u>131</u> (1939) 555
79. C.L. Tsuo	Biochem. J.	<u>50</u> (1952) 493
80. C.L. Tsuo	Biochem. J.	<u>49</u> (1951) 362
81. E.C. Slater	Biochem. J.	<u>45</u> (1949) 1
82. E.C. Slater	Biochem. J.	<u>44</u> (1949) 305
83. H. Beinert	J. biol. Chem.	<u>190</u> (1951) 287
84. M. Reich, W.W. Wainio	J. biol. Chem.	<u>206</u> (1961) 3014 <u>206</u> (1961) 3058
85. H.R. Mahler, N.K. Sarkar, L.P. Vernon	J. biol. Chem.	<u>199</u> (1956) 585
86. H.M. Rauen	Biochem. Taschenb. Springer Verlag	(1956) 1. Ausg. Ste 992
87. S. van der Waerden, W. Nievergelt		
88. A. Wald	Sequential Analysis Interscience Publ.	(1948) 2. Aufl. New York
89. K. Hutschenreuter, K. Pitzler	Zbl. f. Chirurgie	<u>85</u> (1960) 1430
90. E. Klar	Kl. Wochenschr.	<u>49</u> (1914) 1215
91. D. Michel	Ärzt. Forschung	<u>10</u> (1956) I/26
92. S. Proger	Boston Science	<u>104</u> (1946) 389
93. R. Ammon, H. Fedtke	Med. Mschr.	<u>4/5</u> (1948) 141
94. G. Werth	Die Medizinische	<u>13</u> (1958) 1

G) L e b e n s l a u f

Am 5. August 1922 wurde ich als erster Sohn des Baugewerksmeisters Ernst Kalwa und seiner Ehefrau Klara, geb. Mautsch in Deutsch-Krone in Westpreußen geboren.

Von 1928 bis 1932 besuchte ich in meinem Heimatort die Grundschule. Danach kam ich in die Nachbarstadt Jastrow an die Oberschule, die ich 1942 mit dem Abitur verließ. Als Angehöriger der Ärztlichen Akademie der Luftwaffe begann ich nach einer militärischen Grundausbildung als Fahnenjunker das Studium der Medizin in Berlin. Wegen der Kriegsereignisse wurde ich mit der Einheit nach Prag verlegt. Dort absolvierte ich nach dem 4. Semester das Physikum. Nach einem kurzen Truppenarztlehrgang - ebenfalls in Prag - diente ich bei einer San-Einheit der Luftwaffe im Kurland bis zum Kriegsende.

1950 nahm ich das Studium in Frankfurt wieder auf, das ich 1954 mit dem Staatsexamen beendete. Von da an arbeitete ich in mehreren Frankfurter Kliniken und etwa zweieinhalb Jahre als Praxisvertreter, besonders von Landärzten. Seit Oktober 1960 bin ich Hausassistent in einem Frankfurter Belegkrankenhaus.

